MiR-17-5p 靶向自噬相关蛋白 ATG7 调控巨噬细胞抗结核分枝杆菌感染作用的研究

洪丹彤[2]，张帆[2]，王淑娥[2]，王红霞[2]，刘昆梅[3]，徐广贤[1,2]，霍正浩[2,4*]，郭乐[1,2*]

1. 宁夏医科大学总医院，宁夏临床病原微生物重点实验室，宁夏，银川，750021
2. 宁夏医科大学，临床医学院，宁夏，银川，750021
3. 宁夏医科大学，颅脑疾病重点实验室，宁夏，银川，750021
4. 宁夏医科大学,宁夏生殖与遗传重点实验室, 基础医学院，宁夏，银川，750021

摘要:【目的】 通过研究 miR-17-5p 对自噬相关基因 ATG7 的靶向调控机制和对细胞自噬的作用，探究 miR-17-5p 在结核分枝杆菌介导的自噬途径中的作用及其机制。**【方法】** 生物信息学分析得到 miR17-5p 的靶基因 ATG7，通过成功构建载体 ATG7 野生型（pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT）和突变型，利用双荧光素酶报告系统、Western blot 验证 miR-17-5p 和 ATG7 的靶向关系，同时构建结核分枝杆菌（H37Ra）感染的人源性 THP-1 巨噬细胞模型，将做不同处理的细胞分为三组：miR-17-5p mimics，miR-17-5p inhibitor，miR-17-5p nc。通过实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）检测 H37Ra 感染对 miR-17-5p 表达量的影响，并且进一步通过 Western blot、免疫荧光观察检测 LC3 蛋白的表达量和自噬小体的数量。**【结果】** MTB 感染能够引起 miR-17-5p 的下调，随着感染复数的增加有明显的降低。而生物信息学预测结果显示 miR-17-5p 与 ATG7 具有靶向性，双荧光素酶报告实验、Western blot 验证 miR-17-5p 能够和 ATG7 靶向结合，并对其进行负调控。进一步通过 Western blot，免疫荧光观察发现 miR-17-5p mimics 组 LC3 II 的表达下调，自噬小体表达降低，而 miR-17-5p inhibitor 组相反。其中对 H37Ra 感染组与未感染组之间比较，ATG7 和 LC3 II 蛋白表达明显增强。**【结论】** miR-17-5p 直接靶向结合 ATG7 3'UTR 抑制自噬，在巨噬细胞抗 MTB 过程中发挥作用。

关键词： 自噬、结核分支杆菌、miR-17-5p、ATG7

*基金项目：国家自然科学基金（81760359，31600744）；宁夏高等学校科学研究项目（NGY2017088）
*通讯作者：郭乐，副教授，博士，guole@nxmu.edu.cn；霍正浩，教授，硕士，huozhh@nxmc.edu.cn.

MiR-17-5p Targeting Autophagy Related Protein ATG7 Regulates Macrophages Against *Mycobacterium Tuberculosis* Infection

HONG Dan-tong[2, #], ZHANG Fan[2], WANG Shu-e[2], WANG Hong-xia[2], LIU Kun-mei[3], XU Guang-xian[1, 2], HUO Zheng-hao[2, 4, *], GUO Le[1, 2, *]
1. Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
2. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
3. Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
4 Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, PR China

Objective To explore the role and mechanism of miR-17-5p in the autophagy pathway mediated by Mycobacterium tuberculosis by studying the regulatory mechanism of miR-17-5p on autophagy-related gene ATG7 and its effect on cell autophagy. **Methods** The target gene ATG7 of miR-17-5p was obtained by bioinformatics analysis. The wild-type(pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT) and mutant vector of ATG7 were successfully constructed. The targeting relationship between miR-17-5p and ATG7 was verified by double luciferase reporting system and Western blot. THP-1-derived macrophages Infected by Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) were divided into three groups: miR-17-5p mimics, miR-17-5p inhibitors, and miR-17-5p nc. The effect of H37Ra infection on the expression of miR-17-5p was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression of LC3 protein and the number of autophagosomes were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** MTB infection can cause miR17-5p down-regulation, with the increase of infection plural decreased significantly. Bioinformatics predictions showed that miR-17-5p and ATG7 were targeted. Dual luciferase reporter assay and Western blot confirmed that miR-17-5p could bind to ATG7 and negatively regulate it. Western blot and immunofluorescence assay showed that the expression of LC3 II was down-regulated and the expression of autophagosomes was down-regulated in the miR-17-5p mimics group, but the reverse was found in the miR-17-5p inhibitor group. The expression of ATG7 and LC3 II protein in H37Ra infected group was higher than that in uninfected group. **Conclusion** MiR-17-5p directly targets ATG7 3'UTR to inhibit autophagy and plays a role in the anti-MTB effect of macrophages.
[Keywords] autophagy; Mycobacterium tuberculosis; miR-17-5p; ATG7

结核病（*Tuberculosis*，TB）是当今人类三大感染性疾病之一，位于传染病死亡的榜首，已经成为全球第九大致死性疾病[1]。根据世界卫生组织 2018 年的全球结核病报告统计，2017 年全球的结核病潜伏感染人群约 17 亿，全球范围内估计有 1000 万新发结核病病例，其中中国的新发病例数在 88.9 万左右；全球估计结核病死亡人数约有 157 万人[2]。因此，结核病在世界范围的防治形势仍非常严峻。结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*，MTB）是引起结核病的病原菌，巨噬细胞是 MTB 的靶细胞，可通过细胞自噬等免疫防御机制，清除侵入的 MTB[3]。因此自噬作为固有免疫防御 MTB 的机制，将会成为一种有前途的抗结核感染的治疗策略[4]。

自噬是维持细胞内环境稳定的一种保护机制，也是宿主细胞清除侵入 MTB 的天然免疫防御机制之一[5]。它通过双层膜结构的自噬小体将待降解的蛋白、细胞器等吞噬包裹，再与溶酶体融合形成自噬溶酶体进行自我降解的过程，维持细胞内环境稳态，从而为细胞提供能量代谢的需求[6]。它存在三个阶段，自噬小体的形成，自噬溶酶体的形成以及自噬溶酶体的降解，在这个过程中涉及 30 多种自噬相关基因（*Autophagy-related gene*，ATG）的严密调控。而 ATG7 作为一种关键的自噬相关蛋白，在自噬中发挥重要作用[7]。

成熟的微小 RNA（MicroRNA）作为物种间高度保守的、非编码、长度约为 20-24 个核苷酸的单链小分子 RNA[8],可以通过降解 mRNA 或者抑制翻译来负向调控靶基因的表达水平[9]。研究发现许多 microRNA 可以通过互补结合到靶基因的 3'非编码区（3'UTR）来调控其他基因的表达，从而参与一系列的生物学功能，其中包括细胞周期、细胞分化、细胞增殖死亡、凋亡、脂肪代谢、自噬等生理过程[10,11]，还包括心血管疾病、白血病、结核病、肿瘤等病理过程[12,13]。而很多的研究结果显示 microRNA 在 MTB 的感染后表达水平不同，同时它还可以调控许多的自噬关键蛋白。例如，miR-155 在 MTB 中高表达，并通过靶向 ATG3 抑制自噬[14]。miR-144*通过靶向自噬相关蛋白 DRAM2 实现抗结核作用[15]；miR-125a 在 MTB 感染的巨噬细胞中高表达，可靶向结合 BECN1 复合物成分 UVRAG 基因，抑制自噬发生，促进 MTB 胞内存活[16]；miR-33 可以通过调节多种自噬关键蛋白来抑制自噬[17]。这些证据表明，MTB 感染与 microRNA 及自噬有着紧密的联系。miR-17-5p 属于 miR-17-92 家族，miR-17-92 是一个高度保守的 miRNA 簇，位于人类第 13 号染色体上初级转录本 C13orf25 基因的第三个内含子上[18]。而 miR-17-5p 在 MTB 感染中的作用尚不清楚。

因此基于对于结核病、microRNA 及自噬的前期研究基础，我们试图探索 miR17-5p 在结核分枝杆菌介导的自噬途径中的作用及机制。本实验通过验证 miR17-5p 对自噬相关基因 ATG7 的靶向性来探究其对自噬途径的影响。通过构建结核分枝杆菌 MTB 感染的细胞模型，研究在巨噬细胞中 miR17-5p 对自噬介导的结核分枝杆菌的免疫调控作用，从而对结核分枝杆菌感染中的宿主免疫应答过程有更进一步的理解。

1 材料与方法

1.1 材 料

胎牛血清（美国 Gibco 公司）、青链霉素双抗溶液；RPMI1640 培养基、PBS（BI）；mluI,hindXhoI、SalI 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、2×SYBR Green Ⅰ mix（大连 TaKaRa 公司）；质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒（天根生化有限公司）；Lipofectamine™ 2000 转染试剂、Small RNA 提取试剂盒（RNAiso for

SmallRNA)、qRT-PCR 反转录试剂盒（Thermo 公司）；双荧光素酶检测试剂盒、反转录试剂盒（全式金公司）；合成 miR-17-5p 对照（miR-17-5p nc）、miR-17-5p 模拟物（miR-17-5p mimics）、miR-17-5p 抑制剂（miR-17-5p inhibitor）（上海吉玛制药技术有限公司）；Trizol 试剂（Invitrogen 公司）；蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒（凯基生物技术有限公司）；羊抗兔 ATG7、LC3 抗体（abcam）；GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗（proteintech）；PVDF 膜（Millipore 公司）；miR17-5p、ATG7 引物序列的合成、 DNA 的测序服务（上海生工生物有限公司）。pMirGLO 质粒载体、THP-1 细胞、TOP10 感受态细菌均为实验室保存。

1. 2 方法

1.2.1 细胞培养与诱导分化

将人源性 THP-1 单核细胞复苏后，加入 5 ml 含 10% 胎牛血清（FBS）和 100 mg/L 青链霉素的 RPMI1640 培养液，37℃、5% CO_2 培养约 48 h，800 rmp 离心 5 min 传代，继续培养，待细胞增殖状态良好，进入后续实验。将细胞接种到 6 孔板进行培养，用培养基调整细胞浓度为 6×10^5 个/孔，用佛波酯（*phorbol 12-myristate 13-acetate*，PMA）诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞，用 100 ng/ml PMA 处理 24 h，37℃、5% CO_2 培养箱中培养，当细胞形态由单个圆形悬浮细胞,逐渐变为贴壁、形态不规则并伸出伪足，便获得 THP-1 源性的巨噬细胞。

1.2.2 构建结核分枝杆菌感染的 THP-1 巨噬细胞模型

在前期处理的 THP-1 源性的巨噬细胞中加入 H37Ra，调整细菌与细胞的比例为 10∶1（即 MOI=10），培养 6h 后弃上清并更换新鲜完全培养液 2 mL，并将此时作为细胞感染的 0 时，继续培养 24 小时。

1.2.3 脂质体转染 THP-1 源性巨噬细胞

Lipofectamine™ 2000 分别将浓度为 20μmol/L 的 miR-17-5p mimics 和 miR-17-5p inhibitors 转染至巨噬细胞，以对照 miRNA 作对照，37℃、5% CO_2 孵育 10 h 后更换含 10% FBS 的新鲜培养基，继续培养 24 h。

1.2.4 MicroRNA 表达量的检测

H37Ra 以不同感染复数（MOI＝0，1，5，10，20）感染 THP-1 源性的巨噬细胞，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测各组 miR-17-5p 的表达量，同时检测每组 U6 snRNA 的表达量，反应体系为模板 2 μl，PCR 上下游引物各 1 μl，SYBR Premix 10μl，RNA-free water 补充至 20 μl。每组设 3 个平行复孔，计算各组中 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值，U6 snRNA 作为内参基因，分析各组中 miR-17-5p 的表达情况。

1.2.5 MiR-17-5p 相对表达水平的检测

提取对照组、miR-17-5p mimics 组、miR-17-5p inhibitor 组中总 RNA，按反转录试剂盒说明进行反转录合成 cDNA，qRT-PCR 检测 miR-17-5p 的表达量，分析各组细胞中 miR-17-5p 表达情况。

1.2.6 生物信息学预测靶基因

利用生物信息学方法通过一系列生物信息学软件 Target Scan、microRNA. org 等预测得到 miR-17-5p 的靶基因序列 ATG7 3'-UTR，设计合成其上下游引物。ATG7 3'-UTR（Wild-type）的上游引物为 CCCTCGAGCCGTGTAGAGGGCATCGT；下游引物为 GCGTCGACTCAGAGGAGGCAGCAGAAA；ATG7 3'-UTR（Mutant-type）的上

游引物为 CCCTCGAGCCGTGTAGAGGGCATCGT；下游引物为 GCGTCGACTTTCCCTACTATAT CCAGTTACAGTA。从细胞中提取总 RNA，以 2 μlRNA 为模板，ATG7 上下游引物各 1 μl，mix 25 μl，RNA-free water 补充至 50 μl 的体系扩增靶基因，2%琼脂糖凝胶进行电泳，EB 染色 20 min 蒸馏水漂洗后用凝胶成像仪观察目的条带，利用胶回收试剂盒回收目的片段。

1.2.7 载体构建

用 XhoI 和 SalI 酶分别将靶基因和 pMirGLO 质粒双酶切，37℃水浴约 1 h，将靶基因片段和质粒用 T4 连接酶连接，22℃处理 4 h，然后 4℃过夜得到重组质粒，将其转化到感受态细菌中再培养 14 h 左右，挑单个阳性菌落。通过 PCR 和测序鉴定重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 和 pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT。

1.2.8 双荧光素酶报告系统分析

将测序验证后构建成功的重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 和 pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT，与 miR-17-5p mimics 和 inhibitor miR-17-5p 及 miR-17-5p nc 分别共转染 HEK293T 细胞，每组实验 3 个重复，转染 48 h 后，每孔加入双荧光素酶反应试剂，微孔板发光分析仪检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶报告基因的活性。

1.2.9 ATG7 和 LC3 蛋白表达水平的检测

将转染对照、miR-17-5p mimics、miR-17-5p inhibitor 的 THP-1 源性巨噬细胞 8h 后换夜观察转染效率，再分别给予 H37Ra 进行感染或不感染处理，利用凯基蛋白提取试剂盒提取细胞的蛋白质，BCA 法测定各组蛋白质浓度，利用 Western blot 检测 ATG7 和 LC3 的蛋白表达情况。

1.2.10 激光共聚焦显微镜观察细胞免疫荧光

将对照组、miR-17-5p mimics 组、miR-17-5p inhibitor 组的 THP-1 源性巨噬细胞进行爬片以及 4%的多聚甲醛固定，再用 0.2% Triton X-100 室温通透 5min 后用 5% BSA 溶液室温封闭 30 min；之后用 LC3 抗体 37℃孵育 1 h，置于 4℃冰箱孵育过夜；最后用荧光二抗 37℃孵育 1 h，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。激光共聚焦显微镜观察并采集图片。

1. 3 统计学分析

所有数据采用 SPSS20. 0 软件进行统计学分析，每个实验重复 3 次，数据以 x ± SEM 表示，采用单因素方差分析。 *，P＜0. 05；**，P＜0. 01，***，P＜0. 001；P＜0. 05 表示差异有统计学意义。

2.结果

2.1. H37Ra 感染 THP-1 细胞后 miR-17-5p 的表达情况

通过 qRT-PCR 检测 H37Ra 感染 THP-1 后 miR-17-5p 的表达水平，结果显示随着 H37Ra 感染复数的增加，miR-17-5p 的表达量明显下调，当 MOI > 5 时，miR-17-5p 下降较未感染组（MOI=0）有统计学意义。由此我们推测，miR-17-5p 可能参与了 H37Ra 感染细胞的调控过程。

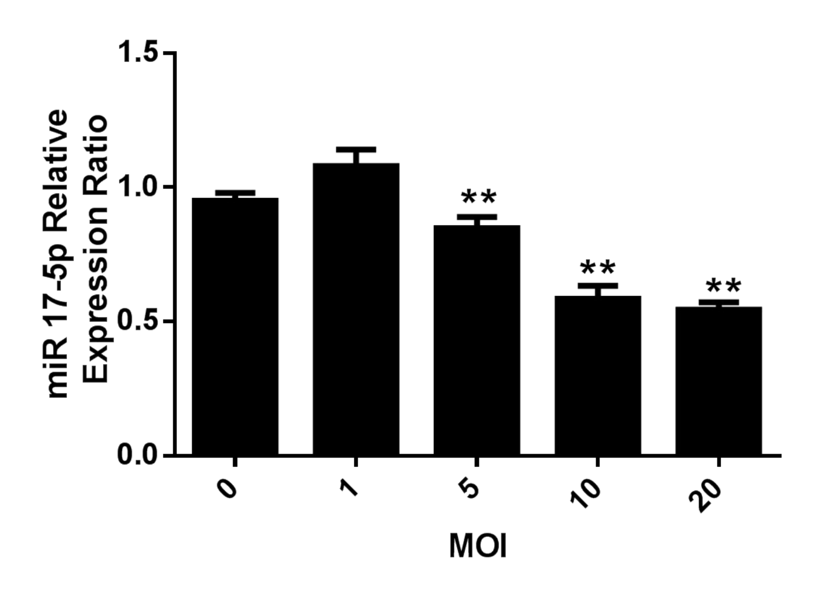


图 1. H37Ra 以不同感染复数（MOI）处理 THP-1 细胞后 miR-17-5p 的表达水平

Fig.1. Relative expression of miR-17-5p in THP-1 infected by H37Ra with different MOI.

2.2. 载体构建及测序结果验证

将 THP-1 源性巨噬细胞提取总 RNA，通过 PCR 技术获得 ATG7-3'UTR 的野生型和突变型基因片段，并将其插入荧光素酶报告基因质粒 pMirGLO 中，得到重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 和 pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT，进一步利用对生物信息学及高通量测序 [19]，利用双酶切和基因测序技术证实荧光素酶报告重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 和 pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT 均已构建成功（图 2）。

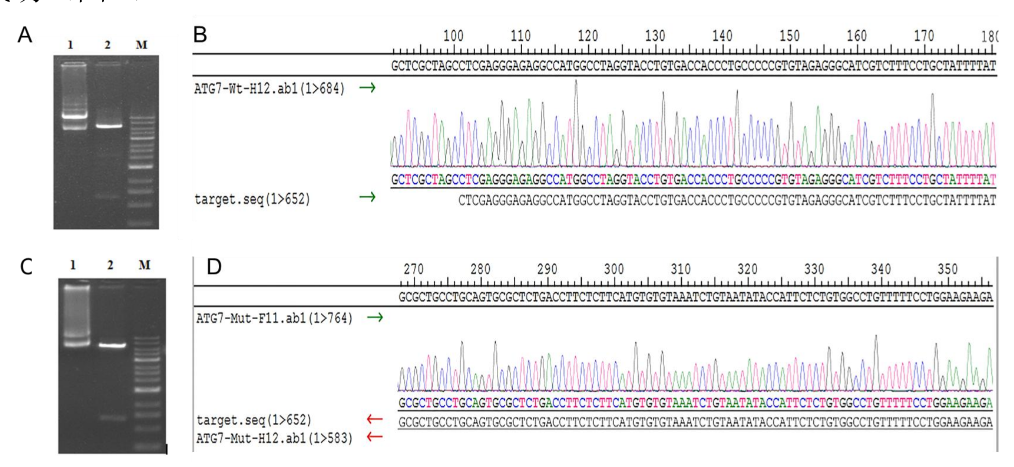


图 2　荧光素酶报告基因重组质粒的鉴定

A. 重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 的双酶切鉴定；1，重组质粒；2，XhoI 和 SalI 双酶切的质粒；3，DNA marker；B. 重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 的基因测序（部分）；C. pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT 的双酶切鉴定；1，重组质粒；2，XhoI 和 SalI 双酶切的质粒；3，DNA marker；D. 重组质粒 pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT 的基因测序（部分）

Fig. 2. Identification of recombinant plasmids

A. Identification of recombinant plasmid pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT by double digestion; 1. Recombinant plasmid; 2. Plasmid digested by XhoI and SalI; 3, DNA marker; B. Gene sequencing of recombinant plasmid pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT (part); C. pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT by

double digestion; 1, recombinant plasmid; 2, plasmid digested by XhoI and SalI; 3. DNA marker, D. Gene sequencing of recombinant plasmid pMirGLO-ATG7-3'UTR-MUT (part).

2.3．MiR-17-5p 对 ATG7 的靶向性验证

通过生物信息学 Target Scan 等软件预测 miR-17-5p 可靶向结合 ATG7- 3'UTR（图 3A）。利用 Lipofectamine™ 2000 将绿色荧光集团 FAM 标记的 microRNA-17-5p mimics 和 inhibitor 转染 HEK293T 细胞，其转染效率约为 50%（图 3B），qRT-PCR 结果表明荧光表达情况与对照组相比，mimics 组中 miR-17-5p 的表达量明显上调，inhibitor 组中明显下调（图 3C），证明 miR-17-5p 过表达和抑制表达的模型构建成功，可继续用于之后的实验。双荧光素酶报告实验显示，与对照组相比，在 ATG7 野生型重组质粒（pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT）和 miR-17-5p mimic 共转染组中，荧光素酶活性显著减低；在 pMirGLO-ATG7-3'UTR-WT 和 miR-17-5p inhibitor 共转染组中，荧光素酶相对活性明显增强；而 ATG7 3'UTR 突变实验组中，miR-17-5p 过表达和抑制表达对荧光素酶相对活性的改变没有统计学意义（图 3D）。由此可见，miR-17-5p 可以靶向结合野生型 ATG7-3'UTR，然而将 ATG7-3'UTR 突变后，miR-17-5p 不能结合于突变型 ATG7-3'UTR。同时，我们也通过 western blot 在 THP-1 源性巨噬细胞中验证 miR-17-5p 对 ATG7 的靶向调控作用。实验结果显示，与对照组（H37Ra + miR-17-5p nc）相比，转染 miR-17-5p mimic 组（H37Ra + miR-17-5p mimic）中 ATG7 蛋白表达量明显下调，然而转染 miR-17-5p inhibitor 组（H37Ra + miR-17-5p inhibitor）中 ATG7 蛋白表达量明显上调（<0.05，图 6），说明 miR-17-5p 可在 H37Ra 感染的 THP-1 源性巨噬细胞中对 ATG7 有负性调控作用。

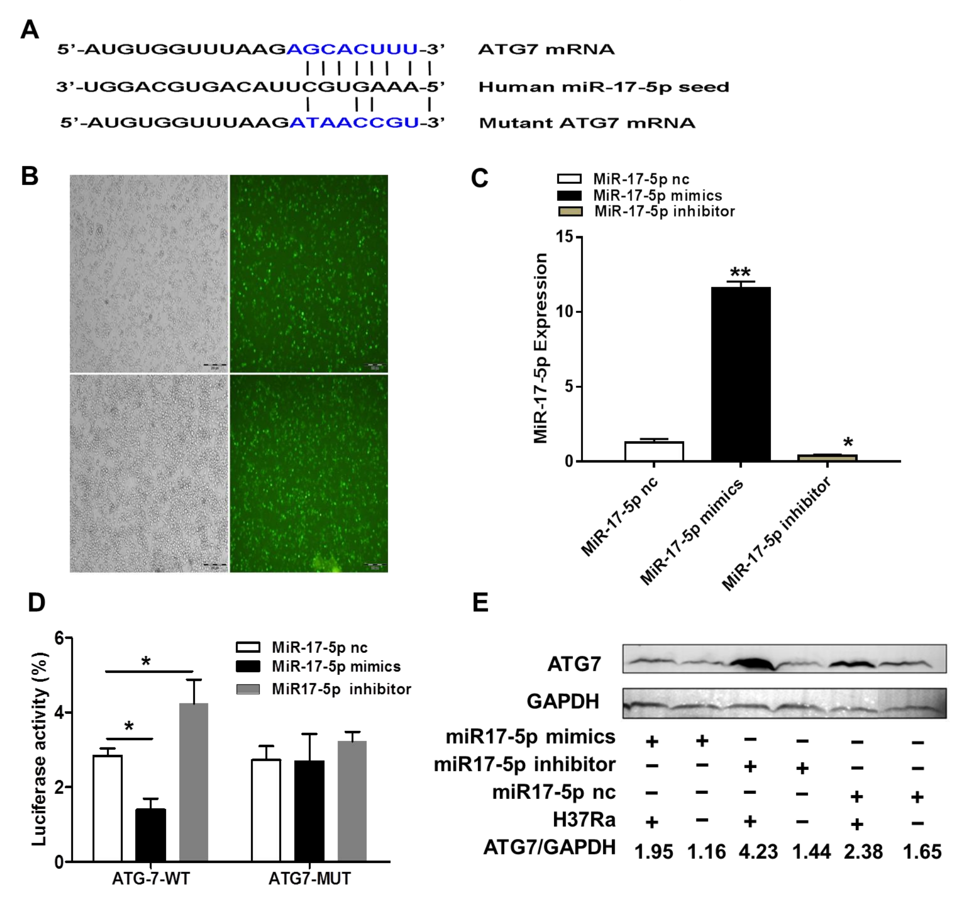


图 3 miR-17-5p 对 ATG7 靶向性的鉴定

A. ATG7 野生型和突变型以及成熟的 miR-17-5p 的部分序列；B.miR-17-5p mimics 和 miR-17-5p inhibitor 的转染效率（分别用普通光学显微镜和荧光显微镜观察，10×10）；C. qRT-PCR 检测 miR-17-5p mimics、miR-17-5p inhibitor 和 miR-17-5p nc 处理 HEK293T 细胞后 miR-17-5p 的相对表达量； D. 相对荧光素酶活性检测；E. Western blot 检测 ATG7 的表达.

Fig. 3 Identification of miR-17-5p targeting ATG7

A. Part of mature miR-17-5p and ATG7 wild type and mutant sequence;B. Transfection efficiency of miR-17-5p mimics and miR-17-5p inhibitor(observed by ordinary light microscope and fluorescence microscope respectively, 10 * 10) ;C.Result of relative expression of miR-17-5p by qRT-PCR;D.Detection of ATG7 relative luciferase activity by dual luciferase report system;E, Results of ATG7 expression by Western blot.

2.4. MiR-17-5p 对自噬流及自噬小体形成的作用

通过激光共聚焦显微镜观察 LC3 蛋白的细胞免疫荧光表现来实现对自噬流动态变化的监控。LC3II 是自噬小体标志蛋白，参与自噬体膜的延伸，可作为自噬流的观察指标，因此 LC3-II 的表达水平是自噬流研究中反映了自噬体数量的一个常用指标，LC3-II 的表达水平与自噬体的数量成正相关，LC3II/LC3I 可以反映细胞发生自噬的水平[20]。由图 4A 可以看出同样在感染 H37Ra 的条件下，抑制 miR-17-5p（miR-17-5p inhibitor）胞质中点状聚集的自噬小体显著增多，而和对照组（miR-17-5p nc）相比，miR-17-5p mimics 组的自噬小体显著降低，表明 miR-17-5p 可抑制自噬的发生。自噬发生前，LC3 以 LC3I 为主均匀分布于胞质中，而自噬的发生会使 LC3I 转化为 LC3 II，呈点状聚集分布可反应自噬小体的数量。实验结果显示，转染 miR-17-5p inhibitor 组中的 LC3II 表达量较对照组（miR-17-5p nc）表达上调，LC3II/LC3I 明显增加，转染 miR-17-5p mimic 组中 LC3II 蛋白表达下调（图 4B）。

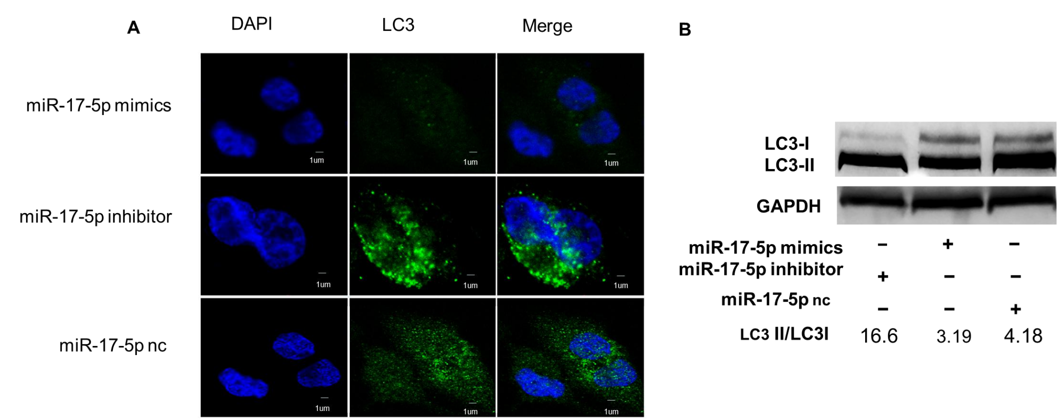


图 4. **MiR-17-5p 对自噬流及自噬小体形成的作用**

A. 细胞免疫荧光检测 LC3 II；B. Western blot 检测 LC3 II 蛋白的表达

Fig.4 Effects of miR-17-5p on autophagy flow and autophagosome formation

A. LC3 II by cell immunofluorescence; **B.** Results of LC3 II expression by Western blot

3 讨论

结核分枝杆菌（MTB）作为一种胞内寄生微生物，其宿主细胞为巨噬细胞，一方面可以诱导细胞自噬的发生，另一方面存在着能够逃避免疫系统杀伤作用的机制。现有的研究也表明 MTB 感染能够引起细胞免疫反应，而 MTB 感染可诱导一定程度的细胞自噬，其机制主要与 MTB 表面脂蛋白、核酸分子等激活模式识别受体 Toll 样受体（*Toll like receptor*，TLR）等固有免疫受体通路有关，TLR

是通过识别细菌表面的病原相关分子模式（PAMPs），在天然免疫反应中发挥重要作用。TLR 可增加细胞因子的合成与释放，还能够促进抗原提呈细胞的成熟，引起机体获得性免疫反应[21]。例如，缺氧诱导 miR-155 上调作用于自噬体形成阶段通过 mTOR 途径来促进自噬[22]；miR-149 靶向 MyD88 负向调控 TLR 引起的炎症反应[23]。自噬是作为维持细胞内环境自稳的保护机制，在固有免疫中发挥着重要的作用，能够抵御病原菌的入侵。MTB 感染可诱发宿主细胞内形成双层膜结构的自噬体，与溶酶体融合，降解吞噬的 MTB，因此，自噬在巨噬细胞抗 MTB 的免疫反应中发挥着主要作用。由于自噬逃逸机制的存在，通过自身特异性成分抑制宿主的自噬，MTB 在细胞内存在潜伏感染，使得 MTB 在巨噬细胞中能存活以及疾病的发生发展过程更加复杂[24]。有研究证实在 MTB 感染中 miR-26 可以通过靶向 KLT4 抑制自噬[25]；miR-30a 可靶向结合 BECN1 抑制自噬发生，在肺结核患者中高表达，经抗结核治疗后 miR-30a 表达下降，促进 MTB 胞内存活[26]。细胞自噬在机体的生理病理过程中扮演着重要角色，因此了解自噬在其中的作用机制有重要意义。

MicroRNA 在自噬的过程中起着精细调节的作用，而我们的研究中也发现在 MTB 感染的人源性巨噬细胞中 miR-17-5p 的表达是明显下调的，也就可以进一步说明在 MTB 感染过程中自噬作用的增强是通过下调 microRNA 来实现的。本实验探究 miR-17-5p 对自噬相关蛋白 ATG7 的直接靶向作用在人源性巨噬细胞（THP-1）抗 MTB 的过程中的作用机制。在 MTB 感染的模型中，miR-17-5p 的表达量随着 MTB 的感染强度的增加呈下调趋势。通过双荧光素酶报告实验、western blot 验证了 miR-17-5p 和 ATG7 的靶向关系，并且 miR-17-5p 是 ATG7 的负调控分子。而 western blot 和免疫荧光的结果 miR-17-5p inhibitor 组 LC3 II 及自噬小体的高表达都表明 miR-17-5p 能够抑制自噬。自噬相关基因 ATG7 和 LC3 在自噬过程中发挥着重要作用。由于 ATG7 作为 E1 激活酶，在自噬过程中作用于膜延伸阶段，而 LC3 I 可在 ATG7 和 ATG3 的作用下与磷脂酰乙醇胺（*phosphatidylethanolamine*，PE）共价结合，形成 LC3 II-PE 复合体（即 LC3 II）[27]。因此我们发现 miR-17-5p 通过抑制 ATG7 影响自噬小体和溶酶体融合以及 LC3 蛋白的循环，从而 LC3 II 的水平下调或者 LC3 II/LC3 I 的比例降低，抑制了自噬体的形成；而 MTB 能够明显降低 miR-17-5p 的表达量，说明 miR-17-5p 是 MTB 感染过程中自噬抵御病原体的途径之一。

miR-17-5p 的下调导致自噬相关蛋白 ATG7 的表达上调，从而促进了自噬小体与溶酶体的融合，增强了自噬作用，但是 miR-17-5p 与调控细胞自噬途径影响 MTB 存活的 MTB 的逃逸机制目前尚不十分明确。而 microRNA 已经成为研究的一大热点。一方面，microRNA 可以作为药物治疗的靶点，在系统性红斑狼疮患者中 miR-125b 被下调，并通过靶向 UVRAG 抑制自噬，从而削弱了细胞对 MTB 的抗感染作用[28]；而在大鼠局灶性脑缺血模型中，miR-9a-5p 可以通过靶向 ATG5

介导的自噬，减轻缺血损伤[29]。另一方面，microRNA 还可以用来作为疾病诊断的标志物，miR-148/152 可以作为急性髓性白血病的诊断标志物[30]。因此本课题的研究为下一步继续完善 miR-17-5p 在巨噬细胞对抗 MTB 的免疫调控作用及其机制，提供一定的理论基础和理论依据。后续的实验将通过进一步对 MTB 与巨噬细胞相关自噬通路之间关系的进行深入探究，研究 MTB 感染以及致病的机制，并且利用 microRNA 的研究进展寻找利于防治结核病的新靶点以及快速诊断的标志物。

参考文献

[1]Amere GA, Nayak P, Salindri AD, et al. Contribution of Smoking to Tuberculosis Incidence and Mortality in High-Tuberculosis-Burden Countries. American journal of epidemiology, 2018, 187(9):1846-1855.
[2]Global tuberculosis report 2018. [2018-12-08]. https://www.aidsdatahub.org/global-tuberculosis-report-2018-who-2018.
[3]Das R, Koo MS, Kim BH, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(32):E2997-3006.
[4]Paik S, Kim JK, Chung C, et al. Autophagy: A new strategy for host-directed therapy of tuberculosis. Virulence, 2018:1-12.
[5]Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. Nature reviews Endocrinology, 2014, 10(6):322-337.
[6]Papackova Z, Cahova M. Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging. Physiological research, 2014, 63(4):409-420.
[7]Frudd K, Burgoyne T, Burgoyne JR. Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. Nature communications, 2018, 9(1):95.
[8]Siddle KJ, Tailleux L, Deschamps M, et al. bacterial infection drives the expression dynamics of microRNAs and their isomiRs. PLoS genetics, 2015, 11(3):e1005064.
[9]Li H, Jin X, Chen B, et al. Autophagy-regulating microRNAs: potential targets for improving radiotherapy. Journal of cancer research and clinical oncology, 2018, 144(9):1623-1634.
[10]Zhang G, Liu X, Wang W, et al. Down-regulation of miR-20a-5p triggers cell apoptosis to facilitate mycobacterial clearance through targeting JNK2 in human macrophages. Cell Cycle, 2016, 15(18):2527-2538.
[11]Yang X, Bai F, Xu Y, et al. Intensified Beclin-1 Mediated by Low Expression of Mir-30a-5p Promotes Chemoresistance in Human Small Cell Lung Cancer. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2017, 43(3):1126-1139.
[12]Li W, Jiang Y, Wang Y, et al. MiR-181b regulates autophagy in a model of Parkinson's disease by targeting the PTEN/Akt/mTOR signaling pathway. Neuroscience letters, 2018, 675:83-88.
[13]Yu K, Li N, Cheng Q, Zheng J, et al. miR-96-5p prevents hepatic stellate cell activation by inhibiting autophagy via ATG7. Journal of molecular medicine, 2018, 96(1):65-74.
[14]Etna MP, Sinigaglia A, Grassi A, et al. Mycobacterium tuberculosis-induced miR-155 subverts autophagy by targeting ATG3 in human dendritic cells. PLoS

pathogens, 2018, 14(1):e1006790.
[15]Kim JK, Lee HM, Park KS, et al. MIR144* inhibits antimicrobial responses against Mycobacterium tuberculosis in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. Autophagy, 2017, 13(2):423-441.
[16]Kim JK, Yuk JM, Kim SY, et al. MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. Journal of immunology, 2015, 194(11):5355-5365.
[17]Ouimet M, Koster S, Sakowski E, et al. Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. Nature immunology, 2016, 17(6):677-686.
[18]Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. Cancer research, 2004, 64(9):3087-3095.
[19]Yang F, Lei Y, Zhou M, et al. Development and application of a recombination-based library versus library high- throughput yeast two-hybrid (RLL-Y2H) screening system. Nucleic acids research, 2018, 46(3):e17.
[20]Gomez-Sanchez R, Yakhine-Diop SM, Rodriguez-Arribas M, et al. mRNA and protein dataset of autophagy markers (LC3 and p62) in several cell lines. Data in brief, 2016, 7:641-647.
[21]Hmama Z, Pena-Diaz S, Joseph S, et al. Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. Immunological reviews, 2015, 264(1):220-232.
[22]Wan G, Xie W, Liu Z, et al. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. Autophagy, 2014, 10(1):70-79.
[23]Xu G, Zhang Z, Xing Y, et al. MicroRNA-149 negatively regulates TLR-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MyD88. Journal of cellular biochemistry, 2014, 115(5):919-927.
[24]Zulauf KE, Sullivan JT, Braunstein M. The SecA2 pathway of Mycobacterium tuberculosis exports effectors that work in concert to arrest phagosome and autophagosome maturation. PLoS pathogens, 2018, 14(4):e1007011.
[25]Sahu SK, Kumar M, Chakraborty S, et al. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBPbeta regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of Mycobacterium tuberculosis to lysosomes during infection. PLoS pathogens, 2017, 13(5):e1006410.
[26]Chen Z, Wang T, Liu Z, et al.Inhibition of Autophagy by MiR-30A Induced by Mycobacteria tuberculosis as a Possible Mechanism of Immune Escape in Human Macrophages. Japanese journal of infectious diseases, 2015, 68(5):420-424.
[27]Panneerdoss S, Viswanadhapalli S, Abdelfattah N, et al. Cross-talk between miR-471-5p and autophagy component proteins regulates LC3-associated phagocytosis (LAP) of apoptotic germ cells. Nature communications, 2017, 8(1):598.
[28]Cao W, Qian G, Luo W, et al. miR-125b is downregulated in systemic lupus erythematosus patients and inhibits autophagy by targeting UVRAG. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2018, 99:791-797.
[29]Wang N, Yang L, Zhang H, et al. MicroRNA-9a-5p Alleviates Ischemia Injury After Focal Cerebral Ischemia of the Rat by Targeting ATG5-Mediated Autophagy. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 45(1):78-87
[30]Wang XX, Zhang R, Li Y. Expression of the miR-148/152 Family in Acute Myeloid Leukemia and its Clinical Significance. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2017, 23:4768-4778.